UMMTO
Faculté de médecine
Département de pharmacie
Laboratoire de microbiologie
4eme année pharmacie

Dr. AZZAM, Dr. HAOUCHINE
Dr BOUTALBI

Faculté de médecine
Département de médecine
Laboratoire de microbiologie
4eme année médecine

Dr CHERIFI

ÉTUDE CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DU LIQUIDE CÉPHALORACHIDIEN (LCR)

Introduction

La méningite infectieuse est une atteinte du système nerveux central limitée aux méninges par opposition à la méningo-encéphalite touchant le parenchyme cérébral.
Les méningites infectieuses se répartissent en trois groupes :

- Les méningites bactériennes
- Les méningites virales
- Les méningites fungiques (souvent liées à une immunodépression)

Etiologies

1/ Méningites bactériennes : Parmi les méningites bactériennes , on distingue les méningites communautaires (acquises en dehors de l'hôpital) et les méningites secondaires.
La majorité des étiologies bactériennes sont responsables de méningites purulentes. Quelques espèces bactériennes peuvent être responsables de méningites lymphocytaires (à liquide clair).

1.1 Méningites purulentes

➢ **Méningites communautaires :** L'épidémiologie des méningites communautaires varie selon l'age du patient.
Les principaux germes responsables de ces méningites sont :

- Neisseria meningitidis : ***Méningocoque***

Différents groupes de méningocoque peuvent être responsables de méningites purulentes, il s'agit des groupes A, B, C, W135, Y, 29E… etc.
En Algérie les groupes les plus fréquemment isolés des méningites purulentes sont les groupes **A** (épidémique), **B et C**. les groupes W135 et Y sont moins fréquents.
Le méningocoque est retrouvé à tous les âges (à partir du 3ème mois de vie).
La méningite à méningocoque est appelée « méningite cérébro-spinale ».

- ***Streptococcus pneumoniae :*** Pneumocoque

Le Pneumocoque est souvent retrouvé suite à un traumatisme crânien ou à une infection sous jacente (otite).
Il est retrouvé surtout aux deux extrêmes de la vie (enfants et personnes âgées).

- ***Haemophilus influenzae b :***

L'Haemophilus influenzae b est retrouvé chez les enfants de moins de deux ans. Il peut être retrouvé avec une moindre fréquence jusqu'à l'âge de cinq ans.

➢ **Méningites néonatales :** Trois espèces bactériennes sont responsables de méningites chez le nouveau né, il s'agit de :

- *Streptococcus agalactiae* (groupe B)
- *E. coli* K1
- *Listeria monocytogenes* (méningite lymphocytaire)

Ces trois germes font partie de la flore génitale normale de la femme.
Ils sont transmis de la mère à l'enfant le plus souvent lors de l'accouchement.ils peuvent être également transmis pendant la grossesse.

➢ **Méningites secondaires :**

Plusieurs espèces bactériennes peuvent être responsables de méningites secondaires à :

- **Une infection sous jacente** (non traitée) telle qu'une infection ORL (otite, sinusite….etc.)
- **Un acte chirurgicale** le plus souvent neuro- chirurgicale. dans ce cas il s'agit de méningites nosocomiales (acquises à l'hôpital).

  Parmi les germes retrouvés on cite :
  - Les entérobactéries (Klebsiella, Proteus, Enterobacter….etc.)
  - Pseudomonas et Acinetobacter
  - *Staphylococcus aureus*….etc.

Les méningites purulentes sont une pathologie grave qui nécessite une hospitalisation, un traitement antibiotique adéquat et une surveillance médicale.

1.2 Méningites lymphocytaires (liquide clair) :

Certaines bactéries peuvent être responsables de méningites lymphocytaires, il s'agit de :

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Leptospira icterohemorragiae*
- *Treponema pallidum*
- *Listeria monocytogenes*

Parfois les méningites à *M.tuberculosis* et *L.monocytogenes* ont une forme panachée au départ (polynucléaires et lymphocytes).

2/ *Méningites virales (lymphocytaires)*

Plusieurs virus possèdent un tropisme pour le système nerveux central (SNC) et être responsables de méningites. Les plus fréquemment retrouvés sont :

- Le virus ourlien (oreillons)
- Les entérovirus non polio (coxsachie virus, entérovirus)
- Les herpes virus (méningo-encéphalites)
- Autres

Mis à part les méningo-encéphalites herpétiques qui sont graves et nécessitent un traitement antiviral en urgence, les autres virus sont responsables de méningites bénignes et nécessitent seulement une surveillance médicale et un traitement symptomatique (antipyrétique).

Le diagnostic d'une méningite est une **urgence médicale**.

I/ PRÉLÈVEMENT :

Le prélèvement du LCR est effectué dans les conditions rigoureuses d'asepsie soit par :

- Ponction Lombaire.
- Ponction sous occipitale.
- Directement dans les ventricules.

Ponction sous-occipitale et Ponction intra ventriculaire sont du ressort du neurochirurgien.

1. ***Ponction Lombaire*** :

Ponctionner le **cul de sac dural :**

- Lavage rigoureux des mains du médecin.
- Le malade assis fortement penché en avant ou placé en décubitus latéral, le dos rond.
- Tracer une ligne joignant les crêtes iliaques.
- Repérer les apophyses épineuses L4 L5 et S1.
- Désinfecter le site de ponction à l'alcool iodé 1 à 2٪ du centre vers la périphérie.
- Introduire l'aiguille à PL munie du mandrin dans un plan strictement médian, avec une direction sagittale oblique de 25° à 30° vers le haut.
- On sent la résistance du ligament inter épineux, puis celle de la dure mère.
- Retirer alors le mandrin.
- La mise en place correcte est confirmée par **l'écoulement en gouttes du LCR**.

➢ On prélève 2-5 ml de LCR dans 3 tubes stériles :
- 1er tube pour l'étude de la **Numération Cellulaire**, **Examen direct** et les **Antigènes solubles**.
- 2ème tube servira à **l'ensemencement des milieux de culture**.
- 3ème tube servira pour la **recherche de BK**.

II/TRANSPORT :

Les prélèvements de LCR seront **transportés rapidement** au laboratoire puis à la paillasse.
Les prélèvements de LCR doivent être **immédiatement analysés**.
Le LCR prélevé peut être ensemencé dans le **milieu de transport pour germes vivants (TGV).**

➢ Fiche de renseignements :

Un minimum de renseignements cliniques concernant le patient doit accompagner le Prélèvement de LCR :

- NOM et Prénom
- Age du patient.
- Service d'hospitalisation
- Contexte clinico épidémiologique.
- Présomption Diagnostic.
- Traitement antibiotique antérieur ou actuel.
- Recherche spécifique d'une bactérie (Mycobacterium tuberculosis).
- Nom du Médecin

III/ ANALYSE :

A) MATÉRIEL :

1. Appareillage :

- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Étuve à 35°C
- Étuve à CO2
- Jarre
- Agitateur
- Microscope optique

2. Verrerie et autre matériel :

- Lames porte objet
- Lamelles
- Tubes secs
- Portoirs de tubes
- Pipettes Pasteur stériles
- Verre à pied
- Anse de platine
- Gant

3. **Réactifs et colorants** :

- Oxydase, H_2O_2, ….
- colorants :
  - Colorants de Gram.
  - Colorants de MGG.
  - Le Bleu de Méthylène.
- Réactifs de détection d'Antigènes solubles : (Pneumocoque, méningocoque A et B, Haemophilus groupe b, Streptocoque du groupe b, E coli K1).

4. **Milieux de culture** :

- Gélose au sang cuit GSC
- Gélose au sang cuit GSC + Supplément poly vit (Poly vitex ou extrait globulaire)
- Gélose au sang frais GSF
- Gélose au sang frais GSF préparée extemporanément si recherche d'anaérobies.
- Gélose nutritive GN
- Bouillon BHIB

B) ***Technique*** :

1er jour

1) *Examen macroscopique* :

Le Premier jour

1. Examen macroscopique :

Liquide clair, eau de roche	**Liquide trouble, Purulent, eau de riz**	**Liquide hématique**	**Liquide ictérique**
- LCR normal - méningite lymphocytaire - méningite bactérienne décapitée. -début de méningite purulente.	**-** Méningite purulente avec infiltration de polynucléaires altérés.	**-**Accident vasculaire ou hémorragie cérébrale : Intérêt de l'épreuve des 3 tubes. *__Hémorragie méningée__ : aspect du LCR est le même dans les 3 tubes.Le liquide ne coagule pas. *__Blessure vasculaire__ : Le LCR se coagule spontanément.	Leptospira icterohemorragiae

N.B : Vérifier toujours l'aspect macroscopique du LCR et le mentionner sur la fiche de réponse.

2) *Mise en culture* :

2.1/ Mise en culture systématique :

- Homogénéiser le prélèvement de LCR.

- Les ensemencements du LCR non centrifugé au niveau du laboratoire seront faits richement (**3 gouttes au moins de LCR**) sur des milieux permettant la croissance des bactéries exigeantes

Responsables de méningites purulentes :

- Gélose au sang cuit (**GSC**)
- GSC + facteurs de croissance
- Gélose au sang frais 5% sang de mouton (**GSF**)

- Gélose nutritive (**GN**)
- Bouillon **BHIB**

- Les boites ensemencées seront incubées à 35-37°C sous atmosphère de **5-10 % de CO_2** pendant **48** heures.
- La GN et le BHIB ensemencés seront incubés à 35°C pendant **48** heures.

2.2/ Mise en culture au lit du malade :

- Lors du recueil du prélèvement par ponction lombaire :
- Laisser tomber 5 gouttes de LCR dans un tube de gélose au sang cuit inclinée.

3) ***Examen microscopique*** :

3.1) La Numération des éléments en cellule de Malassez ou Nageotte :

L'examen microscopique effectué sur :
- LCR complet : La numération s'effectue après agitation douce du LCR complet, non centrifugé :

- Dénombrement de **tous les éléments nucléés/ mm3 du liquide** (PN altérées ou non Altérées, lymphocytes) à l'aide d'un Hématimètre (cellule Nageotte ou cellule Malassez) :

Adulte :

LCR normal contient **< 02 éléments cellulaires /mm3**

Nouveau Né :

LCR normal contient entre **10 – 30 éléments /mm3** (50 % Polynucléaires)

- Dénombrer des **hématies** :

Si le liquide est hémorragique, faire une dilution du LCR dans du sérum physiologique et calculer le rapport hématies / leucocyte :

- >1000 : Rapport sanguin
- < 1000 : processus infectieux

NB : L'addition d'une goutte de **solution alcoolique saturée de Bleu de Méthylène** facilite la différentiation entre Hématies et cellules nucléées par coloration du noyau des cellules.

- Méthode d'utilisation de l'hématimètre :

- Le LCR à analyser doit être fluide
- Si le LCR serait « épais» (pus), le prélèvement doit être dilué dans de l'eau physiologique stérile pour pouvoir énumérer les éléments cellulaires.
- La numération finale sera donnée en tenant compte de la dilution (1/10, 1/20, 1/40, …)
- Agiter le LCR à analyser (remettre en suspension les éléments cellulaires)
- Déposer une goutte sur l'hématimètre
- Déposer la lamelle couvre objet sur les 2 plateaux latéraux de l'hématimètre.
- Lecture se fait au microscope optique au grossissement 40.

3.2) Réalisation de la formule leucocytaire et de la coloration de Gram :

➢ La formule Leucocytaire :

Elle est effectuée :

- après **centrifugation du LCR en tube conique stérile (pendant 10 min)**
- avec coloration au bleu de méthylène : pour différencier entre le PN et les lymphocytes
- ou mieux avec coloration de MGG : pour l'équilibre leucocytaire

- Si **<1 élément / mm3** : ne faire ni MGG, ni Gram
- De **1 à 10 éléments / mm3** et si **syndrome méningé** précisé sur la feuille de demande :
  faire un Gram sur culot de centrifugation du LCR
- Si **>10 éléments** : faire systématiquement 2 lames de coloration du culot de centrifugation du LCR, une pour le bleu de méthylène ou MGG et une pour la coloration de Gram.

Nbre d'éléments / mm3	**< 1 élément**	**1 à 10 éléments Syndrome méningé**		**>10 éléments**
		non	oui	
Gram à partir du culot de centrifugation	-	-	+	+
MGG ou Bleu de Méthylène	-	-	-	+

4) Recherche d'antigènes solubles : Test Rapide

- La recherche des antigènes solubles est effectuée pour :
  - Numération cellulaire positive
  - Méningite décapitée
  - Germes fragiles
- la recherche d'Antigènes solubles concerne les germes suivants :
  - Neisseria meningetidis
  - Streptococcus pneumoniae
  - Haemophilus influenzae
  - Streptocoque du groupe B
  - Escherichia coli K1

NB : Cette recherche est rarement positive en cas d'examen microscopique négatif.

5) Recherches particulières :

- **Recherche de Mycobacterium tuberculosis :**

- Un important volume (4-8 gouttes) de LCR non centrifugé doit être ensemencé sur pente de 2 tubes de Lowenstein Jensen (LJ)

- Les cultures seront incubées pendant 42 à 72 jours à 35°C

- **Recherche de bactéries anaérobies :**

  Ensemencement de 2 boites de GSF (préparées extemporanément) :
  - L'une incubée à 35°C pendant 48 heures en anaérobiose
  - La deuxième incubée à 35°C pendant 5 jours en anaérobiose

- **Recherche de Listeria:**
  - ensemencement d'une boite au sang frais (sang de mouton, cheval ou lapin)
  - les cultures seront incubées à 35° pendant 18 à 24 heures en aérobiose.

- **Recherche de Leptospires :**

  Ensemencement de 10 gouttes de LCR dans 2 tubes de milieux liquides :
  - Milieu de Stuart enrichi en sang de lapin
  - Milieu pour culture des Leptospires

  Les cultures seront maintenues à 28-35°C pendant 1 mois à l'obscurité.

Le Deuxième jour

➢ Lecture des boites de cultures et identification :

Les tests d'orientation :
- aspect des colonies
- Gram
- Oxydase catalase
- Hémolyse

Pour le milieu BHIB :

Les tests d'orientation : Trouble du milieu
- État frai
- Coloration de Gram

Réisolement sur milieux adéquats

➢ Les tests de confirmations :

Une galerie biochimique ou galerie API sont réalisée en fonction des paramétres d'orientation

➢ L'Antibiogramme :

Doit être effectué pour chaque bactérie isolée à partir de la culture du LCR , Les milieux de cultures, les antibiotiques sont choisis en fonction de la bactérie isolée.

Le Troisième jour

- Lecture de l'Antibiogramme

- Sortie des résultats

IV / LA VALIDATION ANALYTIQUE

La validation analytique se fait par l'assistant responsable en poste

